Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Bestimmung der Cortisolkonzentrationen im Urin und Speichel sowie der nicht-proteingebundenen Fraktion im Serum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Michael Matthias Ritter
aus Berlin-Schmargendorf

1983

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Bestimmung der Cortisolkonzentrationen im Urin und Speichel sowie der nicht-proteingebundenen Fraktion im Serum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Michael Matthias Ritter
aus Berlin-Schmargendorf

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. M. Ranke

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

F. und P.

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Methodik	6
2.1.	Geräte, Lieferfirmen und Reagenzien	6
2.2.	Herkunft und Sammlung des Untersuchungsmaterials	7
2.3.	Herstellung von wässerigen Standards und proteinhaltigen Testseren	8
2.4.	Radioimmunologische Bestimmung	9
2.5.	Die Ultrafiltration	11
2.5.1.	Versuchsanordnung	11
2.5.2.	Ablauf einer typischen Ultrafiltration	14
2.6.	Cortisol im Urin	16
2.6.1.	Cortisol im Urin (mit Extraktion)	16
2.6.2.	Cortisol im Urin (ohne Extraktion)	17
2.7.	Bestimmung der Cortisolkonzentration im Speichel	19
3.	Ergebnisse	20
3.1.	Ergebnisse der Methodenentwicklungen	20
3.1.1.	Methodenentwicklung der Urin-Cortisol-bestimmung	20
3.1.2.	Methodenentwicklung der Speichel-Cortisol-bestimmung	25
3.1.3.	Methodenentwicklung der freien Cortisol-bestimmung durch Ultrafiltration	26
3.2.	Theoretische Überlegungen zur Validität einer freien Hormonbestimmung	29
3.3.	Verdünnungsexperimente	31

3.4. Ergebnisse der freien Cortisolbestimmung bei einigen ausgewählten Patienten und gesunden Probanden 34
4. Diskussion 44
4.1. Diskussion der Urin-Cortisolbestimmung 44
4.2. Diskussion der Speichel-Cortisolbestimmung 50
4.3. Diskussion der freien Cortisolbestimmung 52
Zusammenfassung 59
Abkürzungen 60
Literaturverzeichnis 61

1. Einleitung

Thomas Addison machte 1849 mit der Beschreibung des nach ihm benannten Krankheitsbildes erstmals auf die biologische Bedeutung der Nebennierenrinde aufmerksam. Sieben Jahre darauf demonstrierte Charles Brown-Séquard, daß die Entfernung beider Nebennieren den Tod von Versuchstieren zur Folge hatte. Später erkannte man, daß in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde die Biosynthese lebenswichtiger Hormone erfolgt und daß es das Fehlen dieser sogenannten Glucocorticosteroide war, das die klinischen Symptome beim Morbus Addison oder den Tod der Versuchstiere verursachte. In den 50iger Jahren dieses Jahrhunderts gelang dann die Isolierung des Cortisols als dem Hauptvertreter dieser Hormone.

Die lebenswichtige Funktion der Glucocorticosteroide beruht auf der Beeinflussung von Stoffwechselfunktionen in allen lebenden Zellen. An erster Stelle stehen dabei die Förderung der Gluconeogenese, der Glykogenbildung in der Leber und der Fettmobilisierung aus der Peripherie. Diese drei Faktoren werden als sogenannte ergotrope Wirkung zusammengefaßt. Neben der diabetogenen Wirkung führt die dadurch bedingte - überwiegend - katabole Stoffwechsellage zur negativen Stickstoffbilanz und zur Osteoporose. Ferner wird das hämatopoetische System beeinflußt, indem die Erythro-, Granulo- und Thrombozytopoese gefördert werden, während die Proliferation des lymphatischen Gewebes jedoch ebenso wie die Entwicklung der eosinophilen Granulozyten unterdrückt werden.

Schließlich kommt eine antiphlogistische und eine antirheumatische Wirkung durch Hemmung der Proliferation von Bindegewebe, Epithelien und Mesenchym zustande.

Cortisol kommt im Serum größtenteils gebunden an ein α_1 - Glykoprotein, das Transcortin, vor. Nur geringe Anteile sind unspezifisch an Albumin gebunden oder liegen in freier Form vor. Gemäß einem heute allgemein anerkannten Konzept stellt nur dieser freie Anteil den stoffwechselaktiven Teil dar, und nur dieser stellt die Regelgröße im Regelkreis Hypothalamus - Hypophyse - Nebennierenrinde dar. Ob dabei dem gebundenen Anteil eine reine Pufferfunktion zukommt (27) oder ob er darüber hinaus in Abhängigkeit von Dissoziationskinetik und Durchblutung verschiedenen Organen unterschiedliche Mengen Hormon zur Verfügung stellt (24), ist noch Gegenstand der gegenwärtigen Diskussion.

Freies Cortisol und Gesamtcortisol unterliegen einem Schlaf - Wach - Zyklus mit höchsten Werten nach dem Aufstehen und niedrigsten Werten nach dem Einschlafen. Dieser Rhythmus ist nicht kongruent mit dem Tag - Nacht - Zyklus (der sogenannten Circadian- oder diurnalen Rhythmik). Dies muß beim Vergleich von Werten berücksichtigt werden, die zwar zur selben Uhrzeit, aber einmal ambulant und einmal stationär gewonnen wurden.

Der Hypercortizismus (das Cushing - Syndrom) mit einer Prävalenz von unter 1 ‰ sowie der noch seltenere Hypocortizismus (Morbus Addison und sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz) haben trotz ihres geringen Vorkommens große

klinische Bedeutung. Dies liegt daran, daß wichtige klinische Leitsymptome wie z. B. Adipositas, Hypertonie, Osteoporose, Hirsuitismus, Muskelschwäche und verminderte Glukosetoleranz (bei einem Cushing-Syndrom) oder Asthenie, Gewichtsverlust, Übelkeit, Hypotonie und Hypoglykämien (bei einem Hypocortizismus) gleichzeitig Symptome von Nebennierenrindenerkrankungen sind. Klinisch müssen also das Cushing - Syndrom und der Hypocortizismus häufig ausgeschlossen werden (10, 19). Somit werden in erster Linie einfach durchzuführende und sensible Untersuchungsmethoden benötigt, die falsch negative Ergebnisse vermeiden. Am gebräuchlichsten ist die - heute meist radioimmunologische - Gesamtcortisolbestimmung im Serum, die diese Bedingungen jedoch nur unzureichend erfüllt. Zum einen ist eine einzelne Bestimmung auf Grund der beschriebenen Schlaf - Wach - Rhythmik relativ wenig aussagekräftig, weshalb mindestens drei - im Abstand von acht Stunden entnommene - Proben gefordert werden. Der dabei erhobene Befund einer "aufgehobenen Tagesrhythmik" ist zwar von großem klinischen Interesse, da er bei einer Nebennierenrindenfunktionsstörung oft einer Änderung der absoluten Konzentration vorangeht, aber er läßt sich nur schwer standardisieren. Zum anderen kann auf Grund einer Änderung des Plasmabindungsvermögens die Gesamthormonkonzentration beeinflußt werden, ohne daß sich die freie Hormonkonzentration ändert. Für das freie Thyroxin hat erst die Entwicklung einer einfachen Bestimmungsmethode das Erkennen vieler solcher physiologischer und pathologischer Fälle erlaubt.

Die freie Cortisolkonzentration kann aber bis heute nur mit hohem methodischen Aufwand bestimmt werden. Es ist daher zu vermuten, daß es auch beim Cortisol - neben den gut untersuchten Fällen "Hormontherapie" und "Schwangerschaft" - noch andere Zustände gibt, bei denen die Gesamthormonkonzentration den wahren endokrinologischen Status der peripheren Drüse nicht adäquat widerspiegelt.

Eine weitere gebräuchliche Untersuchungsmethode ist die Bestimmung von Steroiden im 24 - Stunden - Urin. Sofern weder Funktionsstörungen der Leber und Niere vorliegen, kann damit auf die Tagessekretion der Nebennierenrinde geschlossen werden. Die meisten gebräuchlichen Verfahren sind allerdings Gruppenreaktionen, die nur zum geringen Teil die Sekretionsprodukte, sondern vor allem deren Metabolite erfassen (8). Lediglich die Bestimmung des Cortisols durch Radioimmunoassay im Urin ist relativ spezifisch, und obwohl Cortisol nur zu etwa 1 % unverändert im Urin erscheint, hat sich dieser Parameter gegenüber der Bestimmung der Porter-Silber-Chromogene und verwandter Methoden überlegen gezeigt (6, 8, 10, 19, 21, 32). Insgesamt gilt die Urin-Cortisolbestimmung derzeit als die beste einzelne diagnostische Methode zur Beurteilung der Nebennierenrindenfunktion, deren Aussagekraft einem zweitägigen hochdosierten (8 mg/die) Dexamethason-Test gleichkommt (10, 21).

Zu den Zielen dieser Arbeit gehörte es, die Ultrafiltration als eine Möglichkeit zur Bestimmung des freien Cortisols zu optimieren. Ferner sollte eine praktikable Methode zur Bestimmung der Cortisolkonzentration im 24 - Stunden - Urin erarbeitet werden. Beide Parameter sollten durch gleichzeitige Bestimmung bei gesunden Probanden und einigen ausgewählten Patienten hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagekraft verglichen werden.

Wegen des zunehmenden Interesses an Bestimmungen der Cortisolkonzentration im Speichel wurde ferner untersucht, ob sich die Sensitivität der radioimmunologischen Bestimmungsmethode soweit verbessern läßt, daß auch in diesem niedrigen Konzentrationsbereich präzise gemessen werden kann.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mit der optimierten Methode zur Bestimmung des freien Cortisols einige Schlußfolgerungen bezüglich der Validität von freien Hormonbestimmungen praktisch zu überprüfen, die aus grundsätzlichen theoretischen Überlegungen gewonnen worden waren (14, 26).

2. Methodik

2.1. Geräte, Lieferfirmen und Reagenzien

Gamma-Counter: W+W electronic, MR 1032, Mod 3/3B

Zentrifuge: Hettich/Roto/Silenta KS

Tischrechner: Hewlett-Packard 9825 A, mit String- Adv. Programming ROM und 9872 A Plotter-Gen. I/O ROM sowie Plotter 9872 A.

Ultrafiltrationszelle: Nr. XX42 025 10 der Firma Millipore GmbH, Neu-Isenburg. Dialysemembran, von Union Carbide Corporation, (6733 West 65th Street, Chicago, Illinois 60638), Maße: 20 DM X100 FT.

Cortisol-RIA-Kit: Firma Clinical Assays, Division of Travenol Laboratories, Inc., Cambridge, Massachusetts. Dieser Kit enthält die mit Antikörper beschichteten Plastikröhrchen, einen 8-Anilin-1-Naphtalinsulfonsäure (ANS) enthaltenden J^{125} - Tracer sowie ein PBS ("Phosphat-buffered-saline") - Puffer - Konzentrat.

Cortisol, p. a.: E. Merck, Darmstadt

Äthanol, absolut, p. a.: E. Merck, Darmstadt

Methylenchlorid, p. a.: E. Merck, Darmstadt

2.2. Herkunft und Sammlung des Untersuchungsmaterials

Die untersuchten Seren und Urine stammten größtenteils von Patienten der Medizinischen Klinik Tübingen und wurden von August 1980 bis Dezember 1980 und erneut von November 1981 bis Dezember 1981 gesammelt. Dazu wurden die während dieses Zeitraums im Radioimmunoassaylabor zur Bestimmung der Gesamtcortisolkonzentration abgegebenen Blutproben durchgemustert. Diejenigen Seren, von denen nach dem Radioimmunoassay noch reichlich Material vorhanden und deren Gesamtkonzentration auffällig war, wurden eingefroren. Sofern der Patient am gleichen Tag 24 - Stunden - Urin zur 20 - Ketosteroidbestimmung gesammelt hatte, wurde davon ein Aliquot eingefroren. Untersucht wurden in der Regel nur die Seren, die um 8^{00} Uhr morgens abgenommen worden waren. Dies war gleichzeitig auch der Beginn der Urin-Sammelperiode. Mit Hilfe der mitgegebenen Angaben zur Person wurde der Patient in eine Kartei aufgenommen. Später wurden dann aus dem Krankenblattarchiv weitere relevante Daten ermittelt.

Einige Seren und Urine stammten von freiwilligen Versuchspersonen. Diese wurden nach der Blutentnahme zusätzlich aufgefordert, 2 ml Speichel in einem Glasgefäß abzugeben.

2.3. Herstellung von wässerigen Standards und proteinhaltigen Testseren

Wässerige Standards wurden durch Einwaage von festem Cortisol hergestellt. Je nach gewünschter Endkonzentration wurden dazu 5 - 20 mg in 100 ml absolutem Äthanol (p. a.) gelöst. Von dieser ersten Stammlösung wurde 1 ml abpipettiert und dieser mit PBS-Lösung ad 100 ml verdünnt. Diese zweite Stammlösung war dann die Ausgangslösung für die endgültigen Standards, die durch weitere Verdünnung mit PBS erhalten wurden.

Die Herstellung von proteinhaltigen Testseren mit definierten freien und Gesamthormonkonzentrationen war sehr viel aufwendiger. Es wurden dafür große Mengen eines sogenannten "Fast-Null-Serums" benötigt, das durch Zusammenpipettieren vieler Seren mit sehr niedrigem (unter 30 nmol/l) Gesamtcortisolgehalt hergestellt worden war. Bei Annahme eines normalen Transcortingehaltes konnte dann berechnet werden, wie weit dieses Serum ungefähr verdünnt werden mußte, damit sich die gewünschten freien Hormon- und Gesamthormonkonzentrationen ergeben konnten. Davon ausgehend wurde dann eine Verdünnungsreihe angelegt, in der verschiedene Mengen des "Fast-Null-Serums" mit der gleichen Menge einer hoch konzentrierten Cortisollösung und mit verschiedenen Mengen Puffer versetzt wurden, so daß das Gesamtvolumen jeweils gleich war und sich die gewünschte Gesamthormonkonzentration ergab. Diese Seren wurden dann ultrafiltriert und so die genaue freie Konzentration

bestimmt. Durch Auftragen der ermittelten freien Konzentration gegen die eingesetzte Menge "Fast-Null-Serum" kann für diese Gesamthormonkonzentration dann die genaue erforderliche Menge "Fast-Null-Serum" bei der gewünschten freien Hormonkonzentration ermittelt werden.

Zusammengefaßt bedeutet dies, daß definierte Testseren hergestellt wurden durch Vorlegen der Gesamthormonkonzentration und durch Variation der Bindungsproteinkonzentration mit dem "Fast-Null-Serum", bis die gewünschte freie Hormonkonzentration eingestellt war.

2.4. Radioimmunologische Bestimmung

Gemäß dem allgemeinen Prinzip eines Radioimmunoassays konkurrieren bei der Bestimmung der Cortisolkonzentration die nicht markierten - mengenmäßig variablen - Moleküle der Probe mit den markierten - mengenmäßig konstanten - Molekülen des Tracers um die vorgegebenen Bindungsplätze an den Antikörpern. Der kommerziell erhältliche, hier benutzte, Radioimmunoassay-Kit war bei Einsatz von 10 ul Proben- oder Standardvolumen und einem Milliliter Tracervolumen für die Bestimmung der Gesamthormonkonzentration optimiert. Es ließ sich zeigen (26), daß ohne großen Verlust an Genauigkeit dieses Testsystem je nach Bedarf so verändert werden konnte, daß die Sensitivität bis um den Faktor 20 verbessert wurde. Indem verdünnte Standards zusammen mit dem entsprechend vergrößerten Standard- (oder

Proben-) volumen in den Test eingesetzt wurden, konnte die Standardkurve so verschoben werden, daß der optimale Meßbereich und der tatsächliche Meßbereich zusammenfielen. Je nach erwarteter Konzentration an Cortisol wurden dementsprechend zur Bestimmung der Urinkonzentration 10, 20, 30 oder 40 ul in den Test eingesetzt. Die Bestimmung im Ultrafiltrat erfolgte mit 100 ul, die im Speichel mit 200 ul Probenvolumen.

Je nach gewünschtem Konzentrationsbereich wurden sechs wässerige Standards - wie oben beschrieben - hergestellt. Die Standards waren dann optimal über den Meßbereich verteilt, wenn - unter Beibehaltung von einem Milliliter Tracervolumen - ihre Endkonzentration im Test jeweils etwa 0, 0.55, 1.37, 2.73, 6.83 und 16.40 nmol/l betrug. Der benutzte Radioimmunoassay-Kit arbeitete mit Plastikröhrchen, an die der Antikörper adsorbiert worden war (solid-phase Methode). In diese Röhrchen wurden Probe und Tracer pipettiert und für 45 min bei 37 ^{o} C inkubiert. Nach Trennung der freien von der gebundenen Fraktion durch Dekantieren wurde letztere im Gammacounter mit ausreichender statistischer Genauigkeit (in der Regel Akkumulation von 10 000 Impulsen) bestimmt. Die Auswertung erfolgte an einem Tischrechner mit einem nicht-linearisierenden Verfahren. Der Zusammenhang zwischen relativem gebundenen Anteil (B/T) und der Konzentration (C) war dabei durch die (halb-empirische) Funktion

$$C = \frac{a}{(B/T)^b} - c\ (B/T)^b$$

mit den Parametern a, b, c gegeben.
Typische Standardkurven werden bei den einzelnen Bestimmungen gezeigt.

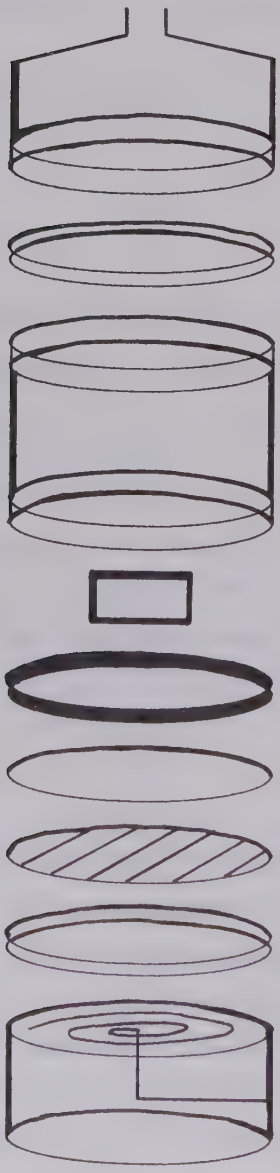
2.5. Die Ultrafiltration

In einer früheren Arbeit (26) wurde eine Ultrafiltrationsmethode beschrieben, die mit einer Intra- und Interassayvariabilität von 4 % und 4.8 % zwar gut reproduzierbare Ergebnisse lieferte, die jedoch auf Grund des großen Aufwands nur für die Ultrafiltration einer geringen Anzahl von Seren brauchbar war. Für diese Arbeit galt es - mit den vorhandenen Mitteln - eine Methode zu entwickeln, die die Ultrafiltration auch vieler Seren in einer vertretbaren Zeit ermöglichte.

2.5.1. Versuchsanordnung

Für Ultrafiltrationsversuche waren neun Ultrafiltrationszellen der Firma Millipore GmbH vorhanden. Den Aufbau einer einzelnen Zelle zeigt Abbildung 1 (Seite 12).
Auf Grund der extremen Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten des Cortisols war die Entwicklung einer Thermostatisierungseinrichtung der Ultrafiltrationszellen entscheidend. Dies wurde durch Beschwerung der einzelnen

Abbildung 1: Aufbau einer Ultrafiltrationszelle



Zellen mit Blei und deren Plazierung in einem Wasserbad erreicht. Daraufhin mußten alle Verbindungen, die mit dem Wasserbad in Berührung kamen und die der Ultrafiltrationsmembran nachgeschaltet waren (also sich im Niederdruckteil der Zellen befanden) zusätzlich abgedichtet werden. Dies gelang durch direktes Aufsetzen von passenden Plastikspritzen an die Auslaßöffnung und durch Einführen eines zusätzlichen Dichtungsringes zwischen der Siebstützplatte und dem Unterteil der Zellen (Abbildung 1). Das ganze Wasserbad wurde auf einem Magnetrührer plaziert. Die Gaszufuhr erfolgte mit Hilfe eines Systems von T-Stücken und Schläuchen direkt aus der Stickstoff-Gasflasche. Anfangs war es problematisch, die insgesamt 34 unter Druck stehenden Verbindungsstellen abzudichten. Dies gelang dann jedoch mit Hilfe von genau angepaßten Schlauchklemmen und Teflonband.

Der große Vorteil des so angeordneten Ultrafiltrationssystems ist die Thermostatisierungsmöglichkeit im Wasserbad bei erhaltener individueller Abschaltmöglichkeit jeder einzelnen Zelle mit Hilfe von Klemmen. So lassen sich gelegentlich auftretende Undichtigkeiten in einer Zelle beheben, während die Ultrafiltration in den anderen Zellen weiterläuft.

2.5.2. Ablauf einer typischen Ultrafiltration

Nach halbstündigem Einlegen der Dialysemembran in PBS-Puffer wurde mit Hilfe der Siebstützplatte die erste Membran passend zugeschnitten. Anschließend erfolgte der Zusammenbau der ersten Zelle und das Einpipettieren von 1.5 Millilitern Probe. Nach Aufsetzen der aufgezogenen 5-Milliliter-Spritze wurde die Zelle im Wasserbad plaziert. Analog erfolgte der Zusammenbau der übrigen acht Zellen. Nach dem Anstellen des Magnetrührers und der auf 37 ^{o} C eingestellten Wasserbadheizung wurde langsam die Gaszufuhr aufgedreht, bis 5 Bar erreicht waren. Nach etwa einstündiger Ultrafiltration wurden die Zellen nacheinander aus dem Wasserbad genommen, die Spritzen entfernt, die Auslaßöffnung sorgfältig abgetrocknet, eine neue aufgezogene Spritze aufgesetzt und die Ultrafiltration im Wasserbad fortgesetzt. Während diesem Auswechseln der Spritzen brauchte der Druck nicht abgelassen werden. Die ersten neun Spritzen wurden sodann auf Menge und Farbe des Ultrafiltrates geprüft und verworfen. Eine Gelbfärbung zeigte eine sichere und ein Volumen über 500 ul eine wahrscheinliche Serum-Durchläßigkeit der Membran an. Nach etwa 40 weiteren Minuten war die Ultrafiltration beendet und nach Ablassen des Gasdrucks wurden alle Zellen aus dem Wasserbad entfernt. Das in den Spritzen befindliche Ultrafiltrat (etwa 200 - 300 ul) wurde in Eppendorf - Cups gefüllt, wobei sorgfältig darauf geachtet werden mußte, daß das Ultrafiltrat nicht durch Wassertropfen verdünnt wurde.

Bis zur radioimmunologischen Bestimmung wurden die Ultrafiltrate sodann eingefroren. Anschließend wurden alle Oberteile der Zellen abgeschraubt und die noch vorhandenen Serumreste aus den Zellen abgesaugt. Nach einem Abspülen der Membran und der Innenwände erst mit destilliertem Wasser, dann mit PBS-Lösung konnten neue Proben eingefüllt werden und eine erneute Ultrafiltration beginnen. Nach jedem etwa achtstündigen Versuchstag, der drei solcher Ultrafiltrationen umfaßte, wurden die Membranen entfernt und die auseinandergebauten Zellen mit Detergentienlösung gereinigt. Bis zum nächsten Versuchstag wurden alle Teile in bidestilliertem Wasser aufbewahrt. So, wie beschrieben, lassen sich 27 Bestimmungen pro Tag durchführen. Um relativ selten auftretende Fehler trotzdem sicher erkennen zu können und um eine Richtigkeitskontrolle durchführen zu können, wurden jeweils vier Proben als Doppelbestimmungen und in der letzten Zelle ein Kontrollserum ultrafiltriert. Somit waren pro Tag 12 Proben bestimmbar. Um auch kleine systematische Fehler der einzelnen Zellen sowie Verschleppungsfehler erkennen zu können, wurde das Kontrollserum jedesmal in eine andere Zelle eingefüllt.

Die radioimmunologische Bestimmung des Ultrafiltrates erfolgte wie oben beschrieben unter Einsatz von 100 ul Proben-, bzw. Standardvolumen.

2.6. Cortisol im Urin

Die radioimmunologische Bestimmung von Cortisol im Urin nach vorheriger Extraktion mit Methylenchlorid ist eine bewährte Methode, mit der neue einfachere Verfahren verglichen werden können.
Um eine neu entwickelte Methode der direkten Bestimmung im Urin zu überprüfen, wurden deshalb die Cortisolkonzentrationen in den 24 - Stunden - Urinen von 20 Patienten nach beiden Methoden ermittelt. Die Richtigkeit der direkten Methode wurde außerdem an Hand von Verdünnungs- und Zumischversuchen geprüft. Ein Urin aus dem mittleren Konzentrationsbereich wurde zur Bestimmung der Intra- und Interassayvariabilität ausgewählt.

2.6.1. Cortisol im Urin (mit Extraktion)

Für die Durchführung von Doppelbestimmungen wurden in vier gekühlte Glasröhrchen je 200 ul des vorher gut gemischten 24 - Stunden-Urins, bzw. eines Aliquots davon, pipettiert. Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz wurden in zwei Röhrchen zusätzlich 10 ul einer hoch konzentrierten (1.38 umol/l) Cortisollösung gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 1 Milliliter kaltem Methylenchlorid in alle vier Röhrchen. Nach Mixen und anschließender Trennung beider Phasen durch Zentrifugation (0 $^{\circ}$ C, 5 min, 1000 g) wurden 100 ul der organischen Phase in die antikörperbeschichteten Röhrchen pipettiert. Die anschließende

Verdampfung unter N_2 - Strom im Eisbad erwies sich als reproduzierbarer als die sonst empfohlene Verdampfung bei Raumtemperatur. Die Cortisolkonzentration in den Röhrchen wurde nach Zugabe von 1 Milliliter Tracer durch Radioimmunoassay bestimmt. Als Standards wurden wässerige Cortisollösungen ohne vorherige Extraktion direkt in den Radioimmunoassay eingesetzt. Dieses Vorgehen ist auf Grund der Ermittlung der Extraktionseffizienz jeder Probe statthaft. Die Extraktionseffizienz berechnete sich durch Subtraktion der Cortisolkonzentrationen der zusammengehörigen Röhrchen und Division durch die Konzentration der zugegebenen Lösung. Proben, deren Extraktionseffizienz unter 70 % lag oder bei denen die Doppelwerte über 5 % der Gesamtaktivität auseinanderlagen, wurden erneut bestimmt.

2.6.2. Cortisol im Urin (ohne Extraktion)

Die direkte Bestimmung des Cortisols im Urin erfolgte - wie oben beschrieben - unter Einsatz von 10, 20, 30 oder 40 ul Urin. Die eingesetzte Urinmenge hing von der erwarteten Urinkonzentration ab, die aus der Urinmenge, an Hand von Vorwerten und unter Berücksichtigung von eventuell schon ermittelten Gesamthormonkonzentrationen abgeschätzt werden kann. In der Regel und wenn keine Anhaltspunkte für die Urinkonzentration vorlagen,

wurden 10 ul Probe in den Test eingesetzt. Da an Standardvolumen ebenfalls 10 ul eingesetzt wurden, mußte bei Verwendung von 20, 30 oder 40 ul Probenvolumen entweder eine zusätzliche Standardkurve erstellt werden, oder für das erhöhte Probenvolumen mußte rechnerisch nach der Formel

$$\text{wahre Konzentration} = \text{ermittelte Konzentration} \times \text{Korrekturfaktor}$$

mit

$$\text{Korrekturfaktor} = \frac{\text{Standardvol.}}{\text{Probenvol.}} \times \frac{(\text{Tracer- + Probenvol.})}{(\text{Tracer- + Standardvol.})}$$

berichtigt werden.

Auf Grund der - unten ausführlich diskutierten - weiten physiologischen Streuung der Werte mußten gelegentlich Proben zweimal bestimmt werden, da sie bei der ersten Messung außerhalb des Meßbereichs lagen.

Bei beiden Verfahren wurde die tägliche Urinausscheidung an Cortisol durch Multiplikation der ermittelten Konzentration mit dem in 24 Stunden gesammelten Urinvolumen berechnet. Bei der Bestimmung nach der Extraktionsmethode erfolgte zusätzlich die Division durch die Extraktionseffizienz.

2.7. Bestimmung der Cortisolkonzentration im Speichel

Trotz der sehr viel geringeren Konzentration im Speichel (1 - 15 nmol/l (28)) eignete sich der verwendete Radioimmunoassay nach Erhöhung der Sensitivität durch Einsatz von 200 ul Proben- oder Standardvolumen auch für die direkte Bestimmung im Speichel.

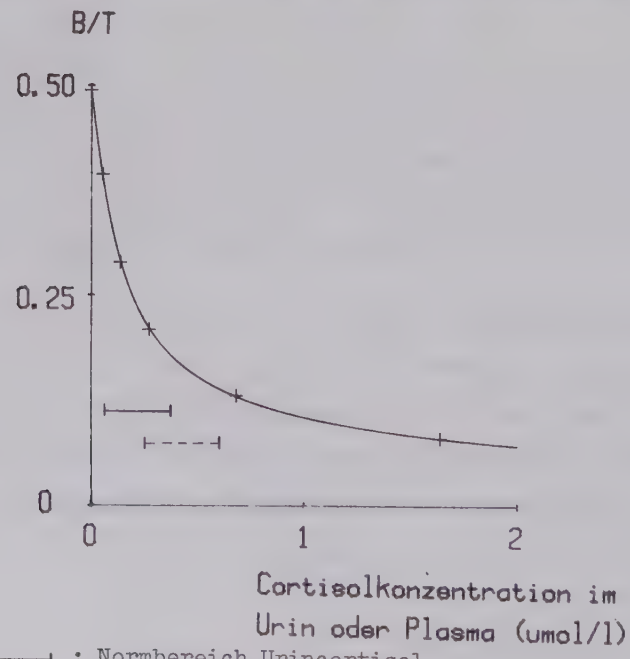
3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Methodenentwicklungen

3.1.1. Methodenentwicklung der Urin-Cortisolbestimmung

Eine typische Standardkurve, wie sie beim Einsatz von 10 ul Proben- oder Standardvolumen erhalten wird, zeigt Abbildung 2. Eine solche Standardkurve wird auch bei der Bestimmung der Gesamthormonkonzentration verwendet. Deren Normalbereich (250 - 600 nmol/l) sowie der Normalbereich der direkten Bestimmung der Cortisolkonzentration im

Abbildung 2: Standardkurve der Urin-Cortisolbestimmung



Urin (70 - 370 nmol/l) sind in die Abbildung eingezeichnet. Der Normalbereich der Extraktionsmethode ist mit 80 - 440 nmol/l nur geringfügig in den günstigeren Bereich der Standardkurve verschoben. Etwas genauer - aber auch noch nicht optimal - erfolgt die Messung der Proben, die zur Ermittlung der Extraktionseffizienz herangezogen werden. Ihr Normbereich liegt zwischen 140 - 490 nmol/l.

Auf Grund des experimentellen Vorgehens bei der Extraktionsmethode werden de facto 20 ul Urin in den Test eingesetzt. Dadurch kommen die im Vergleich zur direkten Bestimmung leicht höheren Normbereiche der Urinkonzentrationen zustande, obwohl die Werte der Tagessekretion um den Faktor 0.6 niedriger liegen (siehe 4.1.).

Einen direkten Vergleich beider Urin-Bestimmungsmethoden gibt Abbildung 3 (Seite 22). Eine Abweichung von einem linearen Zusammenhang ist bei den über das ganze physiologische Spektrum verteilten Werten nicht zu beobachten. Angesichts der bereits oben erwähnten Schwierigkeiten der Extraktionsmethode mit gelegentlich schlechter Extraktionseffizienz und weit auseinander liegenden Doppelwerten ist die Korrelation beider Methoden mit r = 0.92 gut. Diese Fehleranfälligkeit schlägt sich auch in den Werten für die Intra- und Interassayvariabilität nieder (Tabelle 1, Seite 22). Zur Illustration ist in Abbildung 3 für einen Wert das Ausmaß der Interassayvariabilität eingezeichnet. Die größeren Fehler der Extraktionsmethode sind vor allem in der doppelten Anzahl von Pipettierschritten begründet. Daneben trägt zu den Fehlern auch die komplexere experimentelle Prozedur

Abbildung 3: Vergleich der Urin-Cortisolbestimmungsmethoden

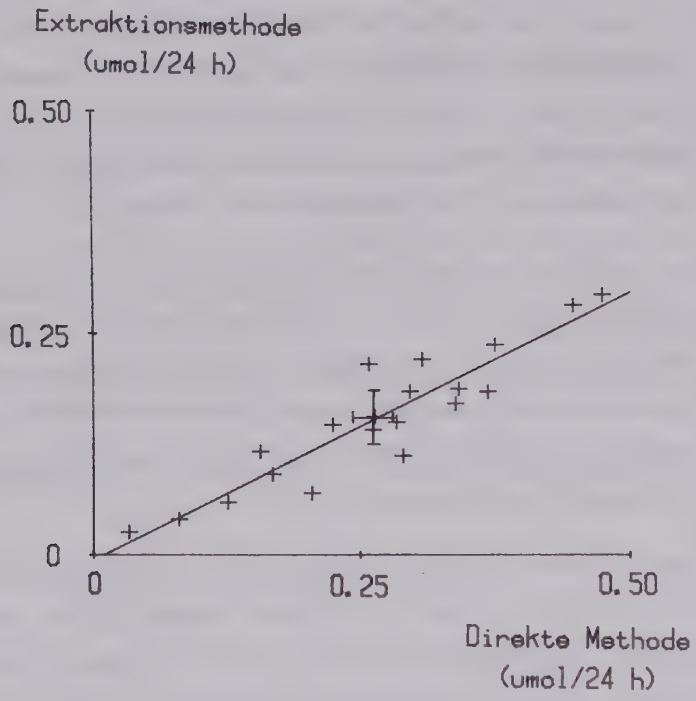


Tabelle 1: Präzision der Cortisolbestimmung im Urin

	Mittelwert (n=12) (nmol/24h)	Intra-assay varianz (%)	Inter-assay varianz (%)
Extraktionsmethode	154.5	4.5	16.0
Direkte Methode	263.8	2.7	8.2

Tabelle 2: Wiederfindung nach Zugabe von Cortisollösungen zu Urinen (direkte Methode)

Ursprüngliche Cortisol-konzentration (nmol/l) (n=6)	Zugegebene Cortisol-konzentration (nmol/l)	Gemessene Cortisol-konzentration (nmol/l) (n=6)	Wieder-findung (%)
0	69	68.9	100
0	138	143.7	104
0	276	270.6	98
15	69	80.6	96
15	138	148.4	97
15	276	285.0	98
82	69	155.0	103
82	138	213.6	97
82	276	347.5	97
130	69	203.2	102
130	138	283.6	106
200	69	270.0	100

und das immer etwas problematische Pipettieren von einem organischen Lösungsmittel mit hohem Dampfdruck bei. Wie unten ausführlich diskutiert, besteht ein gemeinsamer Nachteil beider Methoden darin, daß die Messung der Urinkonzentration oftmals nicht im optimalen Teil der Standardkurve durchgeführt wird.

Die Ergebnisse der Richtigkeitsuntersuchungen für die direkte Bestimmung im Urin zeigen die Tabellen 2 (Seite 23) und 3. Die Wiederfindung ist sowohl bei den Zumischversuchen (Tabelle 2) als auch bei den Verdünnungsexperimenten (Tabelle 3) innerhalb der experimentellen Genauigkeit als komplett anzusehen.

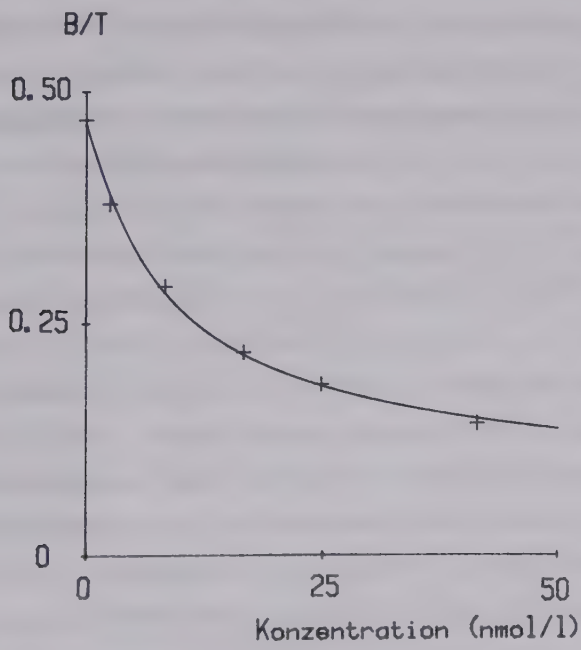
Tabelle 3: Wiederfindung nach Verdünnen von Urinen

Verdünnungsfaktor	Erwartete Cortisolkonzentration (nmol/l)	Gemessene Cortisolkonzentration (nmol/l)	Wiederfindung (%)
1	-	452	-
2	226	223	99
4	113	104	92
8	56.5	56	99
16	28.2	32	113

3.1.2. Methodenentwicklung der Speichel-Cortisolbestimmung

Eine typische Standardkurve zeigt Abbildung 4. Sie demonstriert, daß auch bei einem Einsatz von 200 ul Proben- bzw. Standardvolumen - und der damit verbundenen Steigerung der Sensitivität des Tests um den Faktor 20 - noch eine sinnvolle Messung möglich ist. Nur durch diese Modifizierung des Radioimmunoassays kann die sehr geringe Speichelkonzentration gemessen werden.

Abbildung 4: Standardkurve der Speichel-Cortisolbestimmung



3.1.3. Methodenentwicklung der freien Cortisolbestimmung durch Ultrafiltration

Bei der Abklärung der Ultrafiltration hinsichtlich ihrer Eignung als Verfahren zur Bestimmung des freien Cortisols wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

1.) Aus der Ultrafiltration einer Tracerlösung in vorher und nachher gewogene Eppendorf-Cups berechnet sich die Ultrafiltrationsgeschwindigkeit zu 4 bis 6 ul/min.

2.) Nach der Ultrafiltration von 250 ul sowohl einer Tracer- als auch einer kalten Cortisollösung sind die Konzentrationen im Ultrafiltrat und Überstand identisch. Dies gilt auch für den Fall, daß vorher in der gleichen Zelle eine hochkonzentrierte Lösung ultrafiltriert worden ist. Daraus und aus der Ultrafiltrationsgeschwindigkeit ergibt sich das Auswechseln der Spritzen nach 60 min und das Verwerfen dieses ersten Ultrafiltrates.

3.) Die Konzentration im Ultrafiltrat entspricht nach 60 minütiger Ultrafiltration der eingesetzten Konzentration einer wässerigen Cortisollösung. Somit ist eine - gerade bei Steroiden häufig beobachtete - Adsorption von Cortisol an die Membran ausgeschlossen.

4.) Nach der Ultrafiltration mehrerer verschiedener Seren kann in den Ultrafiltraten mittels einer modifizierten Biuretmethode (1) kein Eiweiß nachgewiesen werden.

5.) Nach höchstens 20 minütiger Thermostatisierung haben sich die Temperaturen des auf 37 $^{\circ}$ C eingestellten Wasserbades und der bei Raumtemperatur in die Zellen einpipettierten Proben angeglichen.

6.)Die Intraassayvariabilität wurde an einem Serum aus dem mittleren Konzentrationsbereich in den neun Zellen ermittelt (Tabelle 4). Sie enthält Fehler durch falsches Pipettieren, falsches Zuschneiden der Membranen, undichte Kammern und sämtliche Fehler der radioimmunologischen Bestimmung. Die Interassayvariabilität wurde an zwei Seren ermittelt (Tabelle 4). Sie enthält zusätzlich die Fehler, die durch Temperaturschwankungen, unterschiedliche Ultrafiltrationsdrücke und unterschiedliche Einweichzeiten der Membran entstehen. Ferner gehen in sie auch Verschleppungsfehler ein, die dadurch entstehen, daß-ohne die Zelle genügend zu säubern oder ohne genügend erstes Ultrafiltrat zu verwerfen-in derselben Zelle zuvor ein besonders hoch

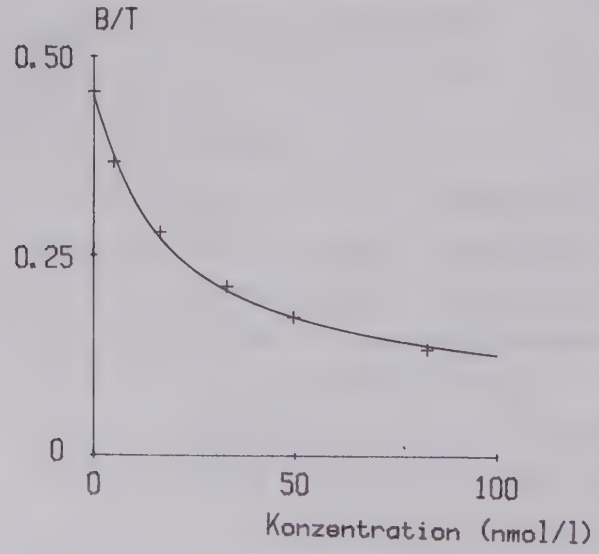
Tabelle 4: Präzision der freien Cortisolbestimmung durch Ultrafiltration

	n	Mittelwert (nmol/l)	Variationskoeffizient (%)
Intraassayvariabilität	9	28.1	2.3
Interassayvariabilität	18	32.9	5.9
	6	43.4	7.2

konzentriertes Serum ultrafiltriert wurde. Um diesen Fehler auch wirklich zu erfassen, wurde streng darauf geachtet, daß zur Ermittlung der Interassayvariabilität jedesmal eine andere Zelle benutzt wurde.
Bei der Interpretation der Werte für die Intra- und Interassayvariabilität ist zusätzlich zu berücksichtigen, daß sie an Hand von Einfachbestimmungen ermittelt wurden. Die eigentlichen Proben wurden aber immer doppelt bestimmt.

Auf Grund der im Ultrafiltrat vorliegenden Cortisolkonzentrationen erweist sich für deren Bestimmung der Einsatz von 100 ul Volumen in den Radioimmunoassay als optimal. Eine typische Standardkurve zeigt die Abbildung 5.

Abbildung 5: Standardkurve der freien Cortisolbestimmung im Ultrafiltrat



3.2. Theoretische Überlegungen zur Validität einer freien Hormonbestimmung

Für das weitere Verständnis ist es nötig, an dieser Stelle kurz die Voraussagen von theoretischen Überlegungen zur freien Hormonbestimmung zusammenzufassen, die an anderer Stelle ausführlich dargestellt worden sind (13, 14, 15). Danach sind die Zugabe eines Antikörpers zu einem Serum und das Verdünnen eines Serums zwei qualitativ identische Vorgänge, die beide zu einer Perturbation des Gleichgewichtes zwischen freier Hormon-, Bindungsprotein- und Gesamthormonkonzentration führen. Die freie Hormonkonzentration wird dabei in der Regel erniedrigt. Das Ausmaß dieser Perturbation des Gleichgewichtes ist neben den Eigenschaften des Hormonsystems von der Bindungsprotein-, bzw. Gesamthormonkonzentration abhängig. Das bedeutet, daß zwei Seren mit ursprünglich identischer freier Hormonkonzentration, aber unterschiedlicher Gesamthormonkonzentration nach der Perturbation des Gleichgewichtes verschiedene freie Hormonkonzentrationen aufweisen werden. Manche Hormonsysteme wie z. B. das Thyroxin - System mit den Bindungsproteinen Thyroxin-bindendes-Globulin (TBG), Thyroxin-bindendes-Präalbumin (TBPA) und Albumin sind gegenüber einer Perturbation des Gleichgewichtes relativ unempfindlich. Das Cortisol-System mit den Bindungsproteinen Transcortin und Albumin dagegen reagiert bereits auf kleine Störungen mit beträchtlichen Schwankungen der freien Hormonkonzentration.

Die geschilderten Zusammenhänge lassen sich mathematisch beschreiben. Die benötigten Gleichungen werden aus dem Massenwirkungs- und Massenerhaltungsgesetz abgeleitet und lauten (26):

Verteilung vor der Perturbation des Gleichgewichtes:

$$H = H_a \left(1 + \frac{P_1}{H_a + k_1} + C\right) \qquad (1)$$

Verteilung nach der Perturbation des Gleichgewichtes:

$$H = H_b \left(d + \frac{P_1}{H_a + k_1} + \frac{d\,P_o}{H_b + k_o} + C\right) \qquad (2)$$

Dabei bedeuten:

H Gesamthormonkonzentration

H_a freie Hormonkonzentration vor der Perturbation des Gleichgewichtes

H_b freie Hormonkonzentration nach der Perturbation des Gleichgewichtes

P_o Gesamtantikörperkonzentration

P_1 Gesamtkonzentration des wichtigsten Bindungsproteins

k_o Dissoziationskonstante des Hormons an den Antikörper

k_1 Dissoziationskonstante des Hormons an das wichtigste Bindungsprotein

d Verdünnung

C Multipliziert mit H_a (oder H_b) ergibt C den Hormonanteil, der an das zweite (und dritte) Bindungsprotein gebunden ist.

3.3. Verdünnungsexperimente

Um die Gültigkeit der Gleichungen 1 und 2 zu belegen, wurden fünf verschiedene Seren definierten Störungen des Gleichgewichtes durch verschiedene Verdünnungen ausgesetzt und anschließend die freie Hormonkonzentration durch Ultrafiltration bestimmt. Wie die Tabelle 5 (Seite 32 und 33) zeigt, fällt die freie Hormonkonzentration nach der Perturbation des Gleichgewichtes durch das Verdünnen in der Tat ab. Die Seren II, III und IV weisen zudem innerhalb der Meßgenauigkeit eine ursprünglich gleiche freie Hormonkonzentration bei unterschiedlichen Gesamthormonkonzentrationen auf. An deren Ergebnissen kann gezeigt werden, daß das Ausmaß der Perturbation von der Gesamthormonkonzentration abhängt. Neben diesen qualitativen Übereinstimmungen mit den Voraussagen der Theorie ergibt sich jedoch auch eine verblüffende quantitative Deckung zwischen Theorie und Experiment. In der letzten Spalte der Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Berechnung der freien Hormonkonzentration vor der Perturbation des Gleichgewichtes (H_a) aufgeführt, wie sie sich aus der gemessenen freien Hormonkonzentration (H_b), aus den Gleichungen 1 und 2 und unter Berücksichtigung der Parameter H, d und C ergeben. Dabei zeigt sich innerhalb der Meßgenauigkeit vor allem bei den niedrigen Verdünnungsstufen eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse untereinander und mit dem Ergebnis der Ultrafiltration des unverdünnten (= nicht perturbierten) Serums.

Tabelle 5: Verdünnungsexperimente mit den Seren I - V

	Verdünnungs-faktor (d)	H_b (bestimmt) (nmol/l)	H_a (berechnet) (nmol/l)
Serum I:			
(H=624	1.5	65.0	71.8
nmol/l,	2.14	57.6	70.7
C=1.84)	3.0	49.8	68.4
	3.75	45.3	67.9
	7.5	35.6	79.8
	15.0	24.9	95.3
Serum II:			
(H=778	1.0	47.2	47.2
nmol/l,	2.0	43.2	48.5
C=1.10)	3.0	41.6	52.3
	3.75	37.9	50.5
	5.0	29.3	39.6
Serum III:			
(H=513	1.0	44.6	44.6
nmol/l,	2.0	38.1	43.8
C=1.41)	3.0	35.6	46.4
	3.75	32.8	46.1
	5.0	28.2	43.2

Fortsetzung Tabelle 5:

	Verdünnungs-faktor (d)	H_b (bestimmt) (nmol/l)	H_a (berechnet) (nmol/l)
Serum IV:	1.0	48.2	48.2
(H=182	2.0	31.0	41.0
nmol/l,	3.0	27.6	46.8
C=0.66)	3.75	24.8	48.8
	5.0	21.5	52.9
Serum V:			
(H=660	1.0	49.8	49.8
nmol/l,	2.0	41.7	47.3
C=1.20)	3.0	37.3	46.9
	3.75	35.0	47.1
	5.0	29.4	42.0
	7.5	27.4	48.5
	14.0	19.8	46.2

Nach Elimination von P_1 aus den Gleichungen (1) und (2) erhält man:

$H_b = p + p^2 + q$ (3) und

$H_a = r + r^2 + s$ (4) mit

$p = (H_a(1+C)-k_1(H/H_a+d-1))/(2(d+C))$

$q = k_1 H/(d+C)$

$r = (H_b(d+C)-k_1(H/H_b-d+1))/(2(1+C))$

$s = k_1 H/(1+C)$

H_a läßt sich so nach Gleichung (4) berechnen.

3.4. Ergebnisse der freien Cortisolbestimmung bei einigen ausgewählten Patienten und gesunden Probanden

Bei der Überprüfung der Methode der freien Cortisolbestimmung an einigen ausgewählten Krankheitsbildern mußte ein Kompromiß zwischen Serumverbrauch einerseits sowie Validität und Genauigkeit der Bestimmung andererseits gefunden werden. Der Einsatz von 3 ml unverdünnten Serums pro Probe wäre für Genauigkeit und Validität optimal gewesen, diese Serummenge stand jedoch in der Regel nicht zur Verfügung. Deshalb wurde jede Bestimmung mit 3 ml des 1:3 verdünnten Serums durchgeführt und anschließend für die Perturbation des Gleichgewichtes mit Hilfe der Gleichung 4 (Seite 33) korrigiert. Dementsprechend ist in den folgenden Tabellen in der zweiten Spalte das Meßergebnis (H_b) und in der dritten Spalte die daraus und aus der Gesamthormonkonzentration (H) berechnete freie Hormonkonzentration (H_a) aufgeführt. Der Serumverbrauch betrug somit 1 ml pro Probe.

Die Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment ist bei dieser Verdünnung noch so gut, daß mit der Korrektur das Problem der Validität gelöst ist. Eine Berücksichtigung von interindividuellen Schwankungen der Albuminkonzentration (die in den Parameter C eingehen) ist unnötig, da selbst extremste Veränderungen von C nur minimale Schwankungen in H_a bewirken. Es wurde generell eine normale Albuminkonzentration angenommen, was für C einen Wert von 1.9 ergibt (26).

Da die Steigung im H_a/H_b - Diagramm generell kleiner als 1 ist, wird mit der Umrechnung auf H_a der experimentelle Fehler vergrößert. Auf Grund der noch genügenden Abhängigkeit zwischen H_b und H_a kann dies bei einer Verdünnung von 3 - nicht aber bei höheren Verdünnungen - toleriert werden. Die Variationskoeffizienten werden im ungünstigsten Fall (hohe freie Hormonkonzentration bei geringer Gesamthormonkonzentration) verdoppelt, erhöhen sich aber in der Regel nur auf das eineinhalbfache.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 - 12 dargestellt. Sie geben einen ersten Eindruck vom Verhalten der freien Cortisolkonzentration bei den verschiedenen Krankheitsbildern und beim Gesunden wieder.

Sofern ein 24 - Stunden - Urin gesammelt wurde, ist das Ergebnis der direkten Bestimmung der Cortisolsekretion in den Urin in der 6. Spalte aufgeführt.

Bei den gesunden Probanden (Tabelle 6) wird in der 7. Spalte das Resultat der Speichelcortisolbestimmung dargestellt.

Tabelle 6: Gesunde Probanden

		$[H_b]$ nmol/l	$[H_a]$ nmol/l	$[H]$ nmol/l	$[H_a]/[H]$ %	Urin-Cortisol nmol/die	Speichel-Cortisol nmol/l	Bemerkungen
MRi	♂	39.6	53.7	477	11.3			
		22.9	28.2	359	7.9			12^{00} Entnahmezeit
		16.4	20.1	240	8.4			17^{00} Entnahmezeit
		19.6	24.4	276	8.8	326	10.1	
SG	♀	51.6	70.2	679	10.3	146	31.0	
DG	♂	49.7	68.1	624	10.9	248	29.9	
MRa	♂	25.5	31.8	384	8.3		13.2	
		31.9	40.1	502	8.0	326	18.8	
BeP	♀	45.7	55.7	991	5.6	127	16.8	Orale Kontrazeptiva
USch	♂	26.1	34.8	293	11.9	309	20.0	
CSch	♀	24.8	31.7	328	9.7	216	34.6	
JR	♀	41.6	51.6	778	6.6	457	41.5	38. Schwangerschaftsw.
UR	♀	42.6	50.8	1016	5.0			39. Schwangerschaftsw.

Tabelle 7: Patienten ohne endokrinologische Erkrankung

		$[H_b]$ nmol/l	$[H_a]$ nmol/l	$[H]$ nmol/l	$[H_a]/[H]$ %	Urin-Cortisol nmol/die	Bemerkungen/Diagnosen
RAdK	♀	35.0	42.5	673	6.3		
FB	♀	27.5	33.7	466	7.2		
BH	♀	29.6	37.8	420	9.0	131	Sudecksche Dystrophie
RK	♀	18.4	21.2	406	5.2	574	Arterielle Hypertonie, Broca + 56 %
GK	♂	18.0	23.5	199	11.8	195	Magenausgangsstenose
CL	♂	18.2	22.3	265	8.4	341	Arterielle Hypertonie, Broca + 49 %
AM	♀	43.2	61.3	436	14.1		BI-Resektion nach Säureverätzung
SB	♂	39.6	51.6	571	9.0	255	Z. n. Op. eines hypernephroiden Ca.
MZ	♀	16.2	19.8	235	8.4	273	Kyphoskoliose, Osteoporose
EW	♀	20.2	25.6	257	10.0	251	Hypercholesterinämie, Colon irritab.
KK	♂	39.8	54.5	455	12.0	296	Arterielle Hypertonie, dialysepflichtige Niereninsuffizienz

Tabelle 8: Patienten mit einer endokrinologischen Erkrankung, aber primär intakter Nebennierenrindenfunktion

		$[H_b]$ nmol/l	$[H_a]$ nmol/l	$[H]$ nmol/l	$[H_a]/[H]$ %	Urin-Cortisol nmol/die	Bemerkungen/Diagnosen
JB	♀	29.4	37.4	425	8.8		Diabetes mellitus I
MRu	♀	36.1	44.5	662	6.7	114	Diabetes mellitus IIB
RD	♀	31.3	40.7	414	9.8	50	Diabetes mellitus II
EJ	♀	14.0	15.7	334	4.7	107	erhöhte Schilddrüsenwerte
LM	♀	58.6	78.3	889	8.8	217	Hypothyreose
JM	♂	28.3	34.9	469	7.4	533	Diabetes mellitus I
YM	♀	19.0	23.5	276	8.5	136	Hyperthyreose, Z.n. Strumaresektion
HP	♂	25.9	33.5	331	10.1	337	Hyperthyreose
EN	♂	20.1	24.2	342	7.1		Diabetes mellitus I
BB	♀	30.2	38.1	455	8.4	202	Diabetes mellitus IIB
							Adipositas permagna, Hypertonie
AF	♀	16.1	18.7	323	5.8		Metastasierendes Mammacarcinom

Tabelle 9: Patienten mit ungeklärter NNR-Funktionsstörung

		$[H_b]$ nmol/l	$[H_a]$ nmol/l	$[H]$ nmol/l	$[H_a]/[H]$ %	Bemerkungen/Diagnosen
HB	♂	17.2	21.7	221	9.8	V. a. Systemerkrankung bei Splenomegalie und Osteoporose, leicht erniedrigte Werte im Cortisoltagesprofil bei erhaltener Tagesrhythmik
EH	♀	67.4	97.6	748	13.0	Schwere Sepsis bei Panarteriitis nodosa
		57.0	81.5	618	13.2	" " " " "
		76.0	114.5	729	15.7	" " " " "
GM	♀	8.8	10.3	144	7.2	Hirsuitismus unklarer Genese, V.a. NNR-Adenom
IB	♀	14.0	16.8	221	7.6	Adipositas permagna, Hypothyreose, Imbezillität
		11.0	13.4	152	8.8	" " " "
EH	♀	12.7	15.4	185	8.3	Hirsuitismus, V. A. Ovarialtumor, Adipositas permagna, aufgehobene Tagesrhythmik

Tabelle 10: Patienten mit Nebennierenrinden-Insuffizienz

		$[H_b]$ nmol/l	$[H_a]$ nmol/l	$[H]$ nmol/l	$[H_a]/[H]$ %	Urin-Cortisol nmol/die	Bemerkungen/Diagnosen
ChCh	♀	6.0	7.1	88	8.1		primäre NNR-Insuffizienz
MLH	♀	4.2	5.8	30	19.3	43	primäre NNR-Insuffizienz
LLCl	♀	1.4	1.5	33	4.5	8	primäre NNR-Insuffizienz
MK	♀	0.0	0.0	30	./.		primäre NNR-Insuffizienz
LK	♀	0.0	0.0	33	./.		primäre NNR-Insuffizienz
RL	♀	0.0	0.0	41	./.		primäre NNR-Insuffizienz
SL	♀	6.6	8.6	58	14.8	31	HVL-Insuff. nach SHTrauma
		5.1	6.2	66	9.4	22	" " (Metopiron-Test)
		7.0	8.6	80	10.8	21	" "
		3.6	7.1	14	50.7	30	" " (Metopiron-Test)
		3.6	6.2	17	36.5	20	" " (Metopiron-Test)
ER	♀	4.2	6.2	25	24.8	125	Panhypopituitarismus (Sheehan S.)
GS	♂	13.3	16.4	155	10.6	160	NNR-Insuff. unklarer Genese

JM	♂	0.0	0.0	25	./.		klinisch Cushing-Syndrom, supprimierte NNR nach langjähriger Glucocorticoid-Medikation
MB	♀	7.2	8.3	127	6.5		sek. iatrogene NNR-Insuffizienz
		17.6	21.2	276	7.7		" " "
JJ	♀	16.8	20.2	262	7.7	201	V.a. sek. iatrogene NNR-Insuffizienz

Tabelle 11: Patienten, bei denen ein Dexamethason-Test durchgeführt wurde

		$[H_b]$ nmol/l	$[H_a]$ nmol/l	$[H]$ nmol/l	$[H_a]/[H]$ %	Urin-Cortisol nmol/die	Bemerkungen/Diagnosen
HK	♀	3.5	4.3	41	10.5	10	M. Cushing, Z. n. bds. Adrenalektomie mit Reimplantation von NNR-Gewebe. Z.n. Op eines Nelson Tu. Jetzt aufgehobene Tagesrhythmik (vergleiche Tabelle 12).
BSch	♀	3.2	3.9	33	11.8	29	Adrenaler Hirsuitismus

Tabelle 12: Patienten mit Cushing-Syndrom

		$[H_b]$ nmol/l	$[H_a]$ nmol/l	$[H]$ nmol/l	$[H_a]/[H]$ %	Urin-Cortisol nmol/die	Bemerkungen/Diagnosen
RU	♀	84.0	123.7	944	13.1	4786	Morbus Cushing
HK	♀	28.8	35.6	464	7.7	280	M. Cushing, Z.n. bds. Adrenalektomie mit Reimplantation von NNR-Gewebe. Z.n. Op eines Nelson Tu. Jetzt ohne Medikation aufgehobene Tagesrhythmik, Cortisol durch Dexamethason supprimierbar (siehe Tabelle 11).
AM	♀	36.2	40.8	1220	3.3		
FrB	♂	69.0	99.6	784	12.7	2261	Z.n. Op eines chromophoben Hypophysenadenoms, Hydrocortison 50-20-0
GB	♀	36.1	41.1	1121	3.7		Hydrocortison-Therapie bei V. a. gemischte Bindegewebserkrankung

MJ	♀	65.6	99.7	569	17.5	M. Cushing (Mikroadenom der Hyph.)
		82.2	127.7	687	18.6	Z.n.Entfernung des Mikroadenoms,
		97.2	154.9	731	21.2	Hydrocortison 15 - 10 - 5
		117.8	184.8	1054	17.5	
		155.6	253.0	1162	21.8	Z.n. Entfernung des Mikroadenoms,
		115.6	183.9	927	19.8	keine Hydrocortison-Therapie mehr,
		96.8	147.3	960	15.3	weiterhin Cushing wegen bilateraler
						NNR-Hyperplasie
		78.2	113.2	927	12.2	Z.n. bilateraler Adrenalektomie
						Hydrocortison 15 - 10 - 5
KO	♀	657.0	1121.0	1656	67.7	Prednisolon-Behandlung wegen
						hyperimmunisatorischer Lymphadeno-
						pathie. Prednisolon zeigt eine
						70 %ige Kreuzreaktion mit den
						Cortisol-Antikörpern

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Urin-Cortisolbestimmung

Analog zur historischen Entwicklung anderer radioimmunologischer Verfahren ist auch hier die erste Routinemethode ein Protein-Radioassay gewesen, der im Methylenchlorid-Extrakt durchgeführt wurde (17, 23). Mit der Entwicklung und der Verbesserung der Spezifität von Cortisol-Antikörpern wurde später dann auch ein Immunoassay erst nach chromatographischer Reinigung des Methylenchlorid-Extraktes (7, 28), dann auch direkt im Extrakt (12, 18) möglich.

In dieser Arbeit wird jedoch erstmals ein Verfahren vorgestellt, das die Bestimmung direkt im Urin erlaubt. Es kann dabei auf den arbeitsintensiven Extraktionsschritt verzichtet werden. So wird - wie die dargestellten Werte für die Intra- und Interassayvariabilität belegen - die Präzision des Tests wesentlich verbessert. Der Zeitaufwand für die Bestimmung von 60 Proben halbiert sich auf etwa drei Stunden, der Bedarf an Antikörper und Tracer ist bei der Bestimmung ohne Extraktion nur halb so groß.

Das Problem jeder Urin-Cortisolbestimmung ist die extreme physiologische Streuung der Werte. Sie kommt dadurch zustande, daß die Konzentration im Urin das Resultat zweier voneinander unabhängiger Parameter ist, nämlich der Exkretion in den Urin und dem Urinvolumen. Bei einer

Optimierung des Verfahrens in der Weise, daß der Meßbereich etwa mit dem Mittelwert der Bestimmung zusammenfällt, liegen hier auf Grund der Heteroskedastizität der Standardkurve weite Bereiche in den Randgebieten mit geringerer Präzision. Dadurch ist es schwierig, bei großen Urinvolumina pathologisch niedrige von noch normalen Konzentrationen und bei kleinen Urinvolumina pathologisch hohe von noch normalen Konzentrationen zu unterscheiden.

Bei einer Messung mit 10 ul Probenvolumen zeigt der Vergleich des Normalbereiches mit dem Meßbereich der Standardkurve (Abbildung 2), daß die Messung nicht im optimalen Bereich erfolgt. Die Messung geringer Cortisolkonzentrationen erfolgt relativ ungenau, dafür können aber relativ hohe Konzentrationen (bis zu 1.6 umol/l) ohne Verdünnung mit guter Präzision bestimmt werden. Wie oben bereits beschrieben, kann jedoch durch den Einsatz von mehr Probenvolumen bei gleicher Tracermenge die Standardkurve weit in den Bereich geringerer Konzentrationen verschoben werden. Wenn man also bereit ist, viele Proben zweimal zu messen, gelingt es immer, jede Probe mit hoher Präzision zu bestimmen. Dieses Problem wird wesentlich vereinfacht, wenn die klinische Fragestellung bekannt ist. Mit dieser Information und unter Berücksichtigung des Urinvolumens kann dann jedes einzelne Probevolumen vor der Bestimmung flexibel festgelegt werden. Geht es also z. B. bei den Symptomen Adipositas und Hypertonie um den Ausschluß oder die Diagnose eines Cushing - Syndroms bei kleinem

Urinvolumen, so würde man relativ wenig Probevolumen (10 ul) in den Test einsetzen und so eine hohe Konzentration mit guter Präzision messen können. Wenn aber der Verdacht einer Nebennierenrindenunterfunktion besteht und große Urinvolumina vorliegen, dann sollten große Probenvolumina (bis 40 ul) in den Test eingesetzt werden.

Da - hier nicht dargestellte - Versuche zeigen, daß unterschiedliche Proben- und Standardvolumina innerhalb gewisser Grenzen durchaus rein rechnerisch berücksichtigt werden können, genügt trotzdem eine einzige Standardkurve, die zudem auch gleichzeitig für die Gesamthormonbestimmung benutzt werden kann.

Daß die mit der Extraktionsmethode gemessenen Werte etwa um den Faktor 0.6 niedriger liegen (vergleiche Abbildung 3), dürfte auf mit dem Antikörper kreuzreagierende (v. a. glucuronierte und sulfatierte) Metabolite zurückzuführen sein, die nach der Extraktion mit dem organischen Lösungsmittel nur in geringem Umfang noch vorhanden sind. Dieser Unterschied zwischen beiden Methoden stimmt gut mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (30, 31), die zeigen konnten, daß sich radioimmunologische Bestimmungen im Urin, nach Methylenchlorid - Extraktion und nach Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wie 6 : 3 : 1 verhalten. Entgegen der von diesen Autoren vertretenen Ansicht steht jedoch gerade bei der Benutzung als Routineverfahren der Gewinn an Spezifität bei Gebrauch der HPLC in keinem Verhältnis zu Aufwand und Kosten.

Die mehrfach bestätigte hohe diagnostische Aussagekraft der Urin-Cortisolbestimmung überrascht angesichts der Einschränkungen, die gemacht werden müssen. Lediglich 1 % (3, 6, 11, 25) oder noch weniger des sezernierten Cortisols werden unverändert im Urin ausgeschieden und dort mit der Bestimmung erfaßt. Die übrigen 99 % werden in der Leber metabolisiert, zum Teil mit Glucuronsäure und Sulfat konjugiert und über die Niere (ca. 70 %), den Darm (ca. 20 %) und die Haut (ca. 8 %) ausgeschieden. Dabei nehmen die Metabolite auch am enterohepatischen Kreislauf teil. Der metabolisierte Anteil ist dabei interindividuell verschieden, variiert aber auch intraindividuell zu verschiedenen Zeiten und unter verschiedenen Einflüssen. Ein verlangsamter Abbau wird bei Lebererkrankungen und Hypothyreose beobachtet, während bei Thyreotoxikose und nach einer Enzyminduktion der Leber der Abbau des Cortisols beschleunigt ist (6, 8, 11, 25). Ebenso schränken natürlich Nierenfunktionsstörungen, insbesondere die Niereninsuffizienz die Aussagekraft der Urin-Cortisolbestimmung erheblich ein (25). Dabei ist die Cortisol-Ausscheidung bei Niereninsuffizienz vermindert, ohne daß sich aber eine Korrelation zum Grad der Niereninsuffizienz feststellen läßt (21).

Wie bei allen quantitativen Urinbestimmungen ist die häufigste Fehlerquelle aber auch hier das falsche Sammeln des 24 - Stunden - Urins. Daraus ergibt sich die Empfehlung, die Meßwerte auf die Kreatinin - Ausscheidung zu beziehen. Möglicherweise kann auch die Verkürzung der Sammelperiode

auf 12 Stunden diese Fehlermöglichkeit vermindern (25). Theoretisch sollte dabei auch die diagnostische Aussagekraft gleich bleiben, sofern bei Verdacht auf ein Cushing - Syndrom der Urin über Nacht, bei Verdacht auf Hypokortizismus der Urin während des Tages gesammelt würde.

Trotz all dieser Einschränkungen ist die diagnostische Aussagekraft der Urin-Cortisolbestimmung groß, weil sie die Integration des entscheidenden freien Hormonspiegels im Plasma darstellt. Dieser freie Anteil wird in der Niere glomerulär filtriert und dann zu 80 bis 90 % - wahrscheinlich passiv - rückresorbiert (3, 29). Daß beim Hyperkortizismus die im Urin ausgeschiedene Menge an Cortisol weit mehr ansteigt als die Exkretion von Cortison, Tetrahydrocortison, Tetrahydrocortisol oder der 17 - Ketosteroide (6), wird als sogenannter "Lupeneffekt" (32) oder als "Schwellenphänomen" (7) bezeichnet. Dieser Effekt beruht darauf, daß die metabolische Kapazität der Leber eine limitierende Größe darstellt. Deshalb steigt beim vermehrten Anfall von Cortisol der nicht - metabolisierte Anteil. Etwa 20 % der normalen täglichen Cortisolproduktion erscheinen nach Reduktion in der Leber als Tetrahydrocortisol und -cortison im Urin. Bei Überfunktion sinkt dieser Anteil auf bis zu 5 % ab (6). Somit können diese beiden wichtigsten Metabolite beim Cushing - Syndrom nur in geringem Maße vermehrt ausgeschieden werden, und ihre Bestimmung hat sich als diagnostische Methode nicht durchsetzen können obwohl einfache radioimmunologische Verfahren entwickelt wurden (35).

Die Nachteile der Urin-Cortisolbestimmung als diagnostische Methode zur Erkennung der Nebennierenrindenunterfunktion beruhen unter anderem auf zwei Gründen:

1.) Die meisten Methoden der Urin-Cortisolbestimmung sind nicht in der Lage, erniedrigte von normalen Konzentrationen präzise zu unterscheiden.

2.) Dieses Problem wird verschärft durch die fehlerhafte Annahme einer Normalverteilung der Urin-Cortisolwerte, obwohl zweifelsfrei geklärt ist, daß die Annahme einer Lognormalverteilung die wahren Verhältnisse besser beschreibt (6, 21). Die korrekte Annahme einer Lognormalverteilung verschiebt Mittelwert und Normalbereich zu höheren Werten.

Die hier vorgestellte Bestimmung des Cortisols im Urin erlaubt aber eine präzise Bestimmung auch niedriger Konzentrationen. Außerdem wurden die (von anderer Stelle) zur Berechnung des Normalbereichs ermittelten Werte zur Berechnung eines neuen Normalbereichs herangezogen, dem eine Lognormalverteilung zugrunde gelegt wurde.

Der in dieser Studie gewonnene erste Eindruck bestätigt, daß mit diesen Modifikationen eine sichere Erkennung der Nebennierenrindenunterfunktion möglich sein wird. Unter den Trennwert von 126 nmol/die fällt kein gesunder Proband (Tabelle 6) und kein Patient mit intakter Nebennierenrindenfunktion (Tabelle 7), während alle Patienten mit eindeutiger Nebennierenrindeninsuffizienz (Tabelle 10) oder nach Durchführung eines Dexamethasontests (Tabelle 11) geringere Werte aufweisen.

Ein Vergleich zwischen der Cortisolausscheidung im 24 - Stunden - Urin und der morgendlichen freien Cortisolkonzentration ist nicht sinnvoll, da beide Parameter nur bei identischer interindividueller Tagesrhythmik und bei einer einheitlichen Entnahmeuhrzeit am gleich Punkt der Schlaf-Wach-Rhythmik sich korrelieren lassen.
Es ist aber typisch für Nebennierenrindenfunktionsstörungen, daß die Tagesrhythmik vor der Änderung der absoluten Werte aufgehoben wird. Bei einem leichten oder beginnenden Cushing - Syndrom sind zum Beispiel die Cortisolkonzentrationen morgens im Serum normal hoch, im Urin finden sich aber eindeutig erhöhte Werte.

Zusammengefaßt ist die Urin-Cortisolbestimmung eine hervorragende - und jetzt auch einfach und genau durchzuführende - Methode für die Diagnose von Nebennierenrindenfunktionsstörungen. Wie alle Bestimmungen im Urin ist sie für den Patienten lästig,und sie ist anfällig gegenüber Fehlern durch falsches Sammeln. In der Regel wird sie bei Begleiterkrankungen der Leber und Niere versagen.

4.2. Diskussion der Speichel-Cortisolbestimmung

Die Bestimmung der Cortisolkonzentration im Speichel (oder im Parotissekret) stellt eine Alternative zur Bestimmung im Serum oder Urin dar. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der streßfreien, nicht invasiven Probengewinnung und darin, daß kein Sammelurin benötigt wird. Darüberhinaus gibt es wichtige Hinweise, daß die Konzentration im

Speichel der Konzentration des freien, nicht-protein-gebundenen Cortisolanteils entspricht. Beide Konzentrationen sind ähnlich gering, und es lassen sich im Speichel keine Cortisol-bindenden Proteine nachweisen. Bei Erkrankungen der Nebennierenrinde und bei Suppressions- oder Stimulations-tests verhält sich die Speichelkonzentration wie die freie Hormonkonzentration. Ferner wird bei einer Östrogen-behandlung oder während der Schwangerschaft im Gegensatz zur Gesamthormonkonzentration keine Konzentrationsänderung beobachtet (16, 25, 34). Ein wichtiges Argument ist auch das Verhalten der Speichelkonzentration während des Schlaf-Wach-Zyklus. Denn während das Verhältnis von höchster zu niedrigster Konzentration bei der Gesamthormon-konzentration nur etwa 3.5 beträgt, schwankt dieses Ver-hältnis bei der Speichelhormonkonzentration um den Faktor 12.2 (16). Diese sehr viel ausgeprägtere Rhythmik ist aber gerade auch für die freie Hormonkonzentration typisch (13).

Die bisherigen radioimmunologischen Methoden benutzten Tritium - markiertes Cortisol als Tracer und führten die Bestimmung entweder nach Extraktion (16) oder direkt im Speichel durch (34). Die Trennung des gebundenen vom freien Anteil erfolgte mit Aktivkohle. Wie die Ergebnisse (Tabelle 6) und die Standardkurve (Abbildung 4) darlegen, ist jedoch auch mit 125 - J - markiertem Cortisol als Tracer ein sinnvoller Test möglich.

Die neun an Normalpersonen ermittelten Beispiele reichen nicht zur zuverlässigen Berechnung eines gültigen Normbereiches aus. Mittelwert (24.0 nmol/l) und Standardabweichung (10.6 nmol/l) sind etwa doppelt so groß wie die einzigen bis jetzt veröffentlichten Werte (13.65 ± 4.88 nmol/l, 71 Normalpersonen (16)).

Zwei Probleme erschweren die Speichelcortisolbestimmung. Zum einen war die Gewinnung von Speichel für einige Probanden offensichtlich unangenehm. Dies kann auf der ungewohnten Prozedur beruhen - während die Venenpunktion jedermann vertraut ist -, möglicherweise spielt aber auch die "Tabuisierung des Ausspuckens"eine Rolle (22). Zum anderen wird die Pipettierung des Speichels durch muköse Anteile erschwert. Dies könnte in Zukunft dadurch umgangen werden, daß die Probanden nach Spülen des Mundes zum Kauen angehalten werden oder daß ihnen geringe Mengen Zitronensäure auf die Zunge geträufelt werden und so der seröse Speichelanteil erhöht wird.

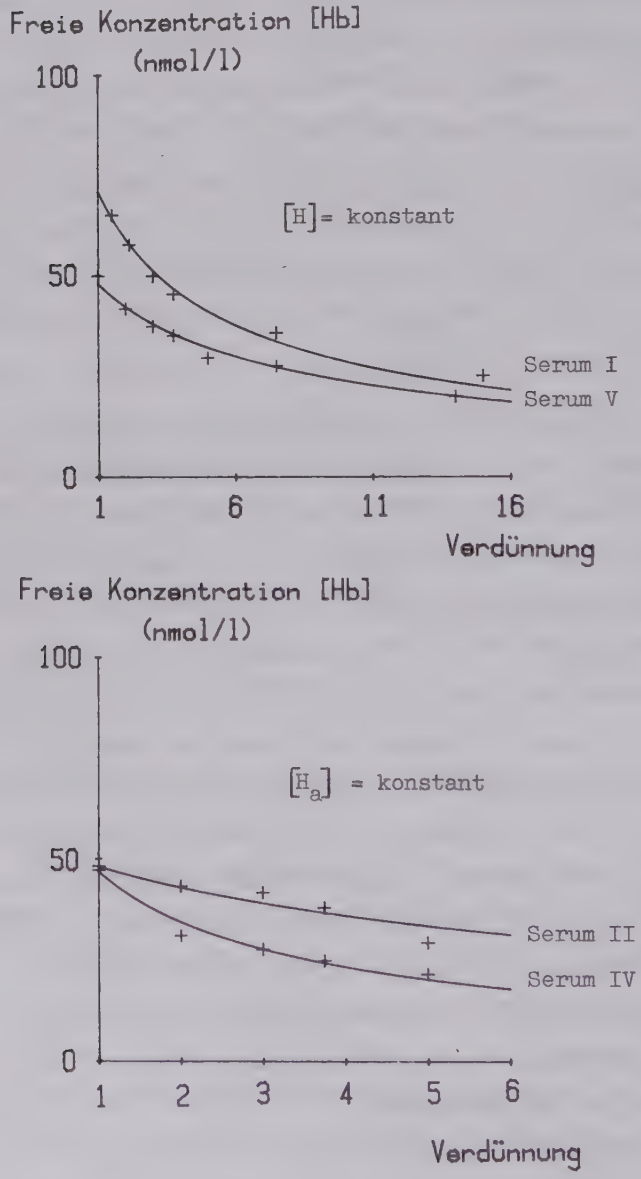
4.3. Diskussion der freien Cortisolbestimmung

Auf Grund der oben zusammengefaßten theoretischen Überlegungen muß jede freie Hormonbestimmung auf die Validität der Messung geprüft werden. Für die Bestimmung des freien Cortisols gilt dabei, daß jede Verdünnung des eingesetzten Serums eine Perturbation des Gleichgewichtes mit einem Absinken der freien Hormonkonzentration bedeutet. Obwohl dieser Effekt schon seit langem bekannt ist (33),

wird er in der Regel bei der Diskussion einer Methode der freien Hormonbestimmung nicht beachtet. Selten nur wird vorsichtig von "apparent free cortisol concentration" geschrieben (4, 5), oder die Autoren kommen zu dem Schluß, daß ein Vergleich aller Proben möglich sei, sofern nur die Serumverdünnung gleich sei (2). Dabei wird jedoch der entscheidende Aspekt des Problems vernachlässigt, nämlich daß die Perturbation des Gleichgewichtes auch bei gleicher Verdünnung auf Grund der interindividuell unterschiedlichen Bindungsproteinkonzentration in allen Proben verschieden sein kann.

Für vier der fünf Seren, an denen die Gültigkeit der Gleichungen 1 und 2 und der damit verbundenen Schlußfolgerungen für die freie Cortisolbestimmung bewiesen wurde, ist dies in der Abbildung 6 nochmals auf andere Art und Weise demonstriert. Sie zeigt durch Auftragung der gemessenen freien Hormonkonzentration (nach der Perturbation des Gleichgewichtes) gegen die die Perturbation verursachende Verdünnung das Ausmaß des Abfalls der freien Konzentration. Im oberen Bild wird dies für die Seren I und V dargestellt, die innerhalb der Meßgenauigkeit eine identische Gesamthormonkonzentration aufweisen. Das untere Bild zeigt den unterschiedlichen Abfall bei ursprünglich gleicher freier Hormonkonzentration H_a, aber verschiedener Gesamtkonzentration (Seren II und IV). Für die Verdünnung d = 1 (unverdünntes Serum) ist die freie Hormonkonzentration mit der wahren freien in-vitro Konzentration identisch, da außer der Verdünnung keine

Abbildung 6: Abhängigkeit zwischen freier Cortisol-konzentration $[H_b]$ und Verdünnung



anderen perturbierenden Faktoren wirksam wurden. Die abgebildeten Kurven stellen den für die betreffende Gesamtkonzentration auf Grund der Gleichungen 1 und 2 geforderten Zusammenhang zwischen H_b und d dar. Die freie Cortisolkonzentration H_a wurde dabei mit Hilfe eines allgemeinen Regressionsprogrammes und Gleichung 3 (S. 33) ermittelt. Sie unterscheidet sich deshalb geringfügig von der bei d = 1 ermittelten freien Konzentration. Die benötigte Albuminkonzentration (die in den Parameter C einfließt) wurde durch Messung des Gesamteiweißes (1) und des relativen Albuminanteils (Elektrophorese) berechnet. Es konnte aber gezeigt werden, daß dieser Parameter praktisch keinen Einfluß auf den Verlauf der Kurven hat (26).

Folgende Schlußfolgerungen lassen sich ziehen:

1.) Das theoretische Modell der freien Hormonbestimmung ist durch praktische Versuche belegt. Damit wird in Zukunft jede freie Hormonbestimmung auf ihre Validität geprüft werden müssen.

2.) Für das freie Cortisol lassen sich die wahre freie in-vitro Hormonkonzentration auch nach einer Perturbation des Gleichgewichtes durch eine Verdünnung bis zu einem Faktor drei mit Hilfe der Gleichungen 1 und 2 berechnen. Damit läßt sich bei einer Bestimmung Serum einsparen. Höhere Verdünnungen erlauben nur noch sehr viel ungenauere Messungen, da kleine Meßfehler sowohl in der freien Hormonkonzentration als auch in der Gesamthormonkonzentration dann große Fehler in der wahren freien in-vitro Konzentration verursachen.

3.) Da bisher kein publiziertes Ergebnis einer freien Cortisolbestimmung der Forderung nach einer Berücksichtigung der Perturbation des Gleichgewichtes genügt, sind alle bisher publizierten Werte für das freie Cortisol zu niedrig bestimmt. Dabei ist zu beachten, daß auch die Dialyse unverdünnten Serums gegen einen Puffer eine Perturbation des Gleichgewichtes verursacht, die einer Verdünnung des Serums gleichkommt.

Die Ergebnisse der freien Cortisolbestimmung bei neun gesunden Probanden (Tabelle 6) und acht Patienten ohne endokrinologische Erkrankung (Tabelle 7, drei Patienten mit arterieller Hypertonie wurden nicht mit einbezogen - obwohl sie das Resultat nicht verändern) lassen sich zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung heranziehen. Den aufschlußreichen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: Zusammenstellung von Ergebnissen zur freien Cortisolbestimmung

Untersucher	Verdünnung	Norm-Mittelwert (nmol/l)	Norm-Standardabweichung (nmol/l)	Probandenzahl
Kley (20), 1977	11	25.8	4.3	70
Clerico (4), 1978	6	25.7	12.5	40
Doe (9), 1969	2.03	36.8	12.5	20
Baumann (2),1975	2	38.1	17.4	18
Ritter, 1982	1	41.5	16.8	17

Mit dieser Tabelle wird versucht, alle bisher publizierten Ergebnisse einer freien Cortisolbestimmung zu erfassen, die folgenden Bedingungen genügen:

1.) Durchführung der Messung bei 37 ^{o} C

2.) Eindeutige Kennzeichnung der Verdünnung, mit der gearbeitet wurde

3.) Blutentnahme zwischen 8^{oo} ind 9^{oo} Uhr.

Gelegentlich für Männer und Frauen getrennt publizierte Werte, - deren Unterschiede nie signifikant waren - sind in dieser Tabelle zusammengefaßt aufgeführt.

Je größer Untersucher die Verdünnung ihrer Methode gewählt haben, desto kleiner wurde der Norm-Mittelwert und desto enger der Normbereich bestimmt. Dieser theoretisch vorhergesagte Effekt übertrifft die Unterschiede, die auf der Anwendung verschiedener Bestimmungsprinzipien beruhen.

Die hier optimierte Methode der Ultrafiltration ist aber nicht nur bezüglich der Validität ihrer Ergebnisse anderen Methoden überlegen. Die Ultrafiltration mit ihrer relativ kurzen Versuchsdauer und die radioimmunologische Bestimmung mit einem solid-phase Verfahren machen sie darüber hinaus für ein indirektes Verfahren überaus praktikabel und kostengünstig. Und schließlich ist sie mit einer Intraassayvariabilität von rund 2.5 % und einer Interassayvariabilität von rund 6.5 % präziser als alle anderen bisher publizierten indirekten Verfahren zur Bestimmung des freien Cortisols.

Es ist zu hoffen, daß mit dieser optimierten Methode die diagnostische Bedeutung der freien Cortisolbestimmung weiter steigen wird. Die nötige Venenpunktion ist sicherlich für den Patienten weniger belastend als das Sammeln des Urins und zumindest für einige Patienten auch angenehmer als die Produktion und Abgabe von Speichel. Ferner besteht bei dieser Methode die Möglichkeit zur Messung der Tagesrhythmik, so daß die darin enthaltene Information nicht wie bei der Urin-Cortisolbestimmung verloren geht. Dies hat umso größere Bedeutung als die Rhythmik des freien Cortisols viel ausgeprägter als die des Gesamthormons oder des Speichelcortisols ist. Die Unabhängigkeit der diagnostischen Aussage von Begleiterkrankungen der Leber und Niere sowie von Änderungen des Plasmabindungsvermögens stellt aber das wichtigste Argument für die Bestimmung des freien Cortisols dar. Hierbei wird der entscheidende Parameter direkt bestimmt, während die Gesamtkonzentrationen im Speichel, Urin oder Plasma immer nur indirekt die Nebennierenrindenfunktion widerspiegeln können.

Zusammenfassung
Michael Matthias Ritter
Bestimmung der Cortisolkonzentrationen im Urin und Speichel sowie der nicht-proteingebundenen Fraktion im Serum

Durch Verbesserung der Sensitivität eines Radioimmunoassays für die Bestimmung des Cortisols im Serum wurde eine Methode zur Messung der Cortisolkonzentration im Urin ohne vorherige Extraktion und ohne chromatographische Reinigung entwickelt. Der Vergleich dieser neuen, sehr einfach auszuführenden Bestimmungsmethode mit einem herkömmlichen Extraktionsverfahren zeigte eine gute Korrelation (r = 0.92). Ebenso belegten Zumisch- und Verdünnungsversuche die Validität der Methode. Die Intra- und Interassayvariabilität betrug 2.7 und 8.2 %. Das Problem der weiten physiologischen Streuung der Meßwerte im Urin konnte durch Einsatz unterschiedlicher Urinmengen gelöst werden, so daß auch extreme Konzentrationen mit guter Präzision gemessen werden können und eine untere Normgrenze festgelegt werden kann. Die Methode gestattet außerdem eine direkte Bestimmung der Cortisolkonzentration im Speichel.

Für die Bestimmung des freien, nicht-proteingebundenen Cortisols im Serum wurde ein Ultrafiltrationssystem mit Möglichkeit zur Thermostatisierung und anschließendem Radioimmunoassay im Filtrat entwickelt. Mit dieser Methode sind neun Einzelbestimmungen simultan möglich. Jede einzelne Ultrafiltrationszelle ist getrennt regulierbar, so daß bei Störungen an einer Zelle (Undichtigkeiten, vor allem der Membranen) die Ultrafiltration der übrigen Zellen fortgesetzt werden kann. Intra- und Interassayvariabilität betrugen 2.3 und 7.2 %. Die Ergebnisse freier Cortisolbestimmungen von gesunden Personen und Patienten mit Erkrankungen der Nebennierenrinde werden dargestellt.

Die Gültigkeit eines theoretischen Modells zur Cortisolverteilung im Plasma konnte durch die Bestimmung der freien Cortisolkonzentration einer Verdünnungsreihe bei fünf Seren mit unterschiedlicher Gesamthormonkonzentration qualitativ und quantitativ voll bestätigt werden. Bei freien Hormonbestimmungen muß aufgrund der Perturbation des Protein-Liganden-Gleichgewichtes durch das Meßsystem das Problem der Validität der Messung besonders berücksichtigt werden. Verdünnung von Serum oder Reaktion mit dem spezifischen Antikörper führt zu einem Absinken der freien Konzentration. Das Ausmaß dieser Perturbation des Gleichgewichtes ist von der Gesamthormonkonzentration abhängig. Dieser Effekt muß quantitativ berücksichtigt werden; er darf nur bei sehr stabilen Systemen - keinesfalls beim Cortisol-Transcortin-Albumin-System - vernachlässigt werden. Es wurde gezeigt, daß das wahre freie Cortisol nur in unverdünntem Serum bestimmt werden kann, wenn die Störung des Gleichgewichtes nicht rechnerisch korrigiert wird. Am Beispiel des freien Cortisols wurde damit die Bedeutung einer mathematisch-modellmäßigen Formulierung des Assay-Systems für die Validität einer freien Ligandenbestimmung dargestellt.

Abkürzungen

ANS	8-Anilin-1-Naphtalinsulfonsäure
B/T	relativer gebundener Anteil ("Bound"/"Total")
H	Gesamthormonkonzentration
H_a	freie Hormonkonzentration vor Perturbation des Gleichgewichtes
H_b	freie Hormonkonzentration nach Perturbation des Gleichgewichtes
PBS	Phosphat buffered Saline
RIA	Radioimmunoassay
TBG	Thyroxin-bindendes-Globulin
TBPA	Thyroxin-bindendes-Präalbumin

Literaturverzeichnis

1. Automatic Clinical Analyzer (ACA), Test Methodology Total Protein, Du Pont Co.
2. Baumann, G., Rappaport, G., Lemarchand-Béraud, T. et al.: Free cortisol index: a rapid and simple estimation of free cortisol in human plasma; J. Clin. Endocrinol. Metab., 40 (1975), 462 - 469
3. Beisel, W. R., Cos, J. J., Horton, R. et al.: Physiology of urinary cortisol excretion; J. Clin. Endocr., 24 (1964), 887 - 893
4. Clerico, A., Del Chicca, M. G., Zucchelli, G. C. et al.: Radioimmunological determination of free (diffusible) cortisol in an equilibrium dialysis system; J. Nucl. Med. All. Sci., 22 (1978), 5 - 10
5. Clerico, A., Del Chicca, M. G., Ghione, S. et al.: Radioimmunological determination of apparent free cortisol concentration: some physiological and clinical applications; Clinica Chimica Acta, 91 (1979), 227 - 231
6. Cope, C. L. et Black, E. G.: The reliability of some adrenal function tests; Brit. Med. J., 2 (1959), 1117 - 1122
7. Deck, K. A., Eberlein, L., Vetter, H., Hillen, H.: Die Bestimmung von freiem Cortisol im Urin; Dtsch. med. Wschr., 101 (1976), 818 - 821
8. Deutsch, E. et Geyer, G.: Laboratoriumsdiagnostik - Normalbereich der Ergebnisse und Interpretation abnormaler Befunde, Verlag Brüder Hartmann, Berlin

9. Doe, R. P., Dickinson, P., Zinneman, H. H. et al.: Elevated nonprotein-bound cortisol (NPC) in pregnancy, during estrogen administration and in carcinoma of the prostate; J. Clin. Endocrinol. Metab., 29 (1969), 757 - 766

10. Eddy, R. L., Jones, A. L., Gilliland, P. F. et al.: Cushing's syndrome: a prospective study of diagnostic methods; Amer. J. Med., 55 (1973), 621 - 630

11. Edwards, C. R. W.: Die Hypothalamus - Hypophysen - Nebennierenrinden - Achse, Medizinische Monographie 10, Amersham Buchler

12. Fahmy, D., Read, G. et Hillier, S. G.: Radioimmunoassay for cortisol: comparison of ^{3}H-, ^{75}Se- and ^{125}J-labelled ligands; J. Endocrinol., 65 (1975), 45P - 46P

13. Geiseler, D., Bohner, J., Ritter, M.: Zur Bestimmung des freien Cortisols im Plasma; Bulletin S.S.C.C./S.G.K.C. - Vol. 21/3 - VIII 1980, 96 - 101

14. Geiseler, D. et Ritter, M.: Free ligand determination by immunoassay: Selection of assay conditions; Anal. Chem., 54 (1982), 2062 - 2067

15. Geiseler, D. et Ritter, M.: The problem of validity in the measurement of free hormones by immunoassay; RIA 82, Advanced Course on Free Hormone Assays and Neuropeptides, Venedig 1982

16. Guechot, J., Fiet, J., Passa, Ph. et al.: Clinical evaluation of saliva cortisol; International Congress of Clinical Chemistry, European Congress of Clinical Chemistry, Venedig 1981

17. Hsu, T. H. et Bledsoe, T.: Measurement of urinary free corticoids by competitive protein-binding radioassay in hypoadrenal states; J. Clin. Endocr., 30 (1970), 443 - 448

18. Kley, H. K., Herberg, L. et Krüskemper, H. L.: Evaluation of adrenal function in mice by measurement of urinary excretion of free corticoids; J. Steroid Biochem., 7 (1976), 381 - 385

19. Kléy, H. K.: Aktuelle endokrinologische Diagnostik: Das Nebennierenrindensystem; Dtsch. Ärzteblatt, 74 (1977), 207 - 212

20. Kley, H. K., Bartmann, E. et Krüskemper, H. L.: A simple and rapid method to measure non-proteinbound fractions of cortisol, testosterone and oestradiol by equilibrium dialysis: comparison with centrifugal filtration; Acta Endocrinologica, 85 (1977), 209 - 219

21. Köbberling, J., v. zur Mühlen, A. et Hesch, R. D.: Die diagnostische Bedeutung der freien Harnkortikoide bei Adipositas und bei Störungen der Nebennierenrinden-funktion; Schweiz. med. Wschr., 103 (1973), 1347 - 1354

22. Mester, H.: Die Mundhöhle als Intimsphäre; Psychother. med. Psychol., 28 (1978), 85 - 98

23. Murphy, B. E. P.: Clinical evaluation of urinary cortisol determinations by competitive protein-binding radioassay; J. Clin. Endocr., 28 (1968), 343 - 348

24. Pardridge, W. M.: Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo; RIA 82, Advanced Course on Free Hormone Assays and Neuropeptides, Venedig 1982

25. Riad-Fahmy, D., Read, G. et Hughes, I. A.: Corticosteroids; aus: Gray, C. H. et James, V. H. T.: Hormones in blood; Vol. 3, 3. Auflage; Academic Press, 1979

26. Ritter, M.: Zur Problematik der indirekten Bestimmung des freien Cortisols im Serum; Diplomarbeit Universität Tübingen, 1981

27. Robbins, J.: The significance of multiple transport proteins for the thyroid hormones; RIA 82, Advanced Course on Free Hormone Assays and Neuropeptides, Venedig 1982

28. Ruder, H. J., Guy, R. L. et Lipsett, M. B.: A Radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine; J. Clin. Endocrinol. Metab., 35 (1972), 219 - 224

29. Schedl, H. P., Chen, P. S., Greene, G. et Redd, D.: The renal clearance of plasma cortisol; J. Clin. Endocr., 19 (1959), 1223 - 1229

30. Schöneshöfer, M., Fenner, A. et Dulce, H. J.: Interferences in the radioimmunological determination of urinary free cortisol; Clinica Chimica Acta, 101 (1980), 125 - 134

31. Schöneshöfer, M., Fenner, A., Altinok, G. et Dulce, H. J.: Specific and practicable assessment of urinary free cortisol by combination of automatic high-pressure liquid chromatography and radioimmunoassay; Clinica Chimica Acta, 106 (1980), 63 - 73

32. Stolecke, H.: Free urinary cortisol as a representative steroid of the urinary Porter-Silber-Chromogens; Acta Endocrinologica, 70 (1972), 65 - 72

33. Tait, J. F. et Burstein, S.: In vivo studies of steroid dynamics in man; aus: Gregory, P., Thimann, K. V. et Astwood, E. B.: The Hormones - Physiology, Chemistry and Applications; Vol. V, Academic Press New York and London, 1964

34. Walker, R. F., Riad-Fahmy, D. et Read, G. F.: Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva; Clin. Chem., 24 (1978), 1460 - 1463

35. Will, H., Aderjan, R., Winkler, Th. et al.: Radioimmunoassays of tetrahydrocortisone and tetrahydrocortisol in human urine; Acta Endocrinologica, 86 (1977), 369 - 379

Bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Radioimmunoassay Labors, besonders bei Frau Ute Rehn, möchte ich mich für Hilfsbereitschaft und Entgegenkommen ganz herzlich bedanken.

Ohne die jetzt knapp dreijährige enge und vertrauensvolle Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dietrich Geiseler wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen. Nach der Einarbeitung in das Arbeitsgebiet verdanke ich unserem kritischen und offenen Dialog wertvolle Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Eggstein für die Bereitstellung eines Laborplatzes und das immer vorhandene ermutigende Interesse bei der Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Als Sohn des damaligen wissenschaftlichen Assistenten Dr. Gerhard A. Ritter und seiner Ehefrau Gisela Ritter, geb. Kleinschmidt, wurde ich, Michael Matthias Ritter, am 24. Dezember 1955 in Berlin-Schmargendorf geboren.

In Berlin besuchte ich von 1962 bis 1966 die Grundschule am Rüdesheimer Platz und anschließend für ein halbes Jahr das Evangelische Gymnasium zum Grauen Kloster. Mit dem Umzug meiner Eltern nach Münster in Westfalen wechselte ich auf den humanistischen Zweig des Städtischen Schillergymnasiums in Münster und bestand dort am 6. 6. 1974 die Reifeprüfung. Meine Schulausbildung in Berlin und Münster wurde durch Auslandsaufenthalte meiner Eltern unterbrochen. Deshalb habe ich 1965 für drei Monate die Flynn Park School in St. Louis, während der Jahre 1965 und 1966 für sechs Monate die Sutton Courtnay Primary School in Sutton Courtnay bei Oxford und 1971 bis 1972 für sechs Monate die Berkeley High School und die Universität in Berkeley besucht.

Nach einem einsemestrigen Chemiestudium an der Westfälischen Wilhelms Universität in Münster wechselte ich zum Sommersemester 1975 an die Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und begann mit dem Studium der Biochemie. Mit der Abgabe einer Arbeit "Zur Problematik der indirekten Bestimmung des freien Cortisols im Serum" erhielt ich am 29. Juni 1981 den akademischen Grad eines Diplom-Biochemikers verliehen. Seit dem Sommersemester 1976 war ich zusätzlich im Fach Medizin immatrikuliert. Nach dem Bestehen der ärztlichen Prüfung am 20. 4. 1982 bin ich seit dem 29. 4. 1982 als Arzt approbiert.